

Interphase cytogenetics in the cytodiagnosis of leptomeningeal metastases

Citation for published version (APA):

van Oostenbrugge, R. J. (1999). *Interphase cytogenetics in the cytodiagnosis of leptomeningeal metastases*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19990625ro>

Document status and date:

Published: 01/01/1999

DOI:

[10.26481/dis.19990625ro](https://doi.org/10.26481/dis.19990625ro)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER 8

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Leptomeningeal metastases (LMM) are a serious neurological complication of systemic cancer. The exact incidence is unknown, although it can be found at autopsy in approximately 8% of cancer patients. LMM must be suspected in any patient known with cancer and presenting with neurological symptoms or signs. LMM can also be the first manifestation of a malignant disease. Hence, early treatment of LMM can prevent neurological sequelae; it is important to diagnose LMM as early as possible, preferably even before neurological signs develop. It is generally accepted that a definitive diagnosis can only be achieved by the detection of malignant cells in the cerebrospinal fluid (CSF). However, CSF cytology is only moderately sensitive and repeated cytological examinations are often needed to establish the final diagnosis of LMM. This may cause serious time delay before the appropriate treatment can be initiated. In order to improve the diagnostic assessment of patients with LMM we performed several studies, which are described in this thesis.

We first determined the additional value of clinical features and of some routine diagnostic tests in patients with known LMM in order to improve the diagnostic assessment in case of a negative first CSF cytology. Secondly, in order to improve the diagnostic sensitivity in CSF cytology, we increased the number of cells on the slides. Thirdly, we analyzed the feasibility and diagnostic value of interphase cytogenetics in the cytodagnosis of LMM. This technique allows the visualization of chromosomal aberrations in interphase nuclei, based on *in situ* hybridization with labeled DNA probes. Although interphase cytogenetics has been performed on several body fluids such as urine, blood and pleural fluid, it had not been used before on CSF.

Once the diagnosis of LMM has been established, treatment with chemotherapy or radiation can be initiated. Because of the potential risks of intrathecal chemotherapy, and for an adequate treatment protocol, the response to treatment must be monitored accurately. Currently, monitoring of response to therapy is achieved by consecutive CSF cytodiagnoses. However, the sensitivity of CSF cytology decreases during (prolonged) therapy due to a decrease in the cell numbers and the occurrence of reactive, atypical cells. Other parameters like the neurological condition or immunological tumor markers are also weak predictors of response. Therefore, the ISH technique was applied as an alternative method to improve the follow up of therapy.

CHAPTER 1 reviews the literature on clinical features of LMM and the sensitivity of the currently used diagnostic tests. Although the studies reviewed were rather heterogeneous, it can be concluded that CSF cytology is still the single most important diagnostic test for LMM at this moment, although its sensitivity is only moderate.

CHAPTER 2 reports on a study of the presenting neurological features and the value of routine diagnostic procedures related to the histological type of the primary malignancy, involving 45 patients with proven LMM. It was found that patients have a different clinical presentation depending on the histology of the primary tumor. Most patients with LMM of hematological malignancies showed cranial nerve dysfunction at the time of presentation, whereas patients with LMM of solid tumors mostly presented with spinal and radicular symptoms and signs.

This difference may be explained by different routes of dissemination from the different primary malignancies to the leptomeninges. LMM of solid tumors virtually always present with adjacent bone marrow metastases, suggesting the propagation of malignant cells from these metastases to the leptomeninges.

By contrast, hematological LMM develop via hematogenous spreading to the leptomeninges, preferentially at the base of the skull, due to the well developed blood supply in this region. Further studies are needed, however, to increase the knowledge on the pathogenesis of LMM. The differences in the neurological symptoms at the time of presentation are not useful for a diagnosis of LMM. However, it could be demonstrated that the majority of these patients presented with multifocal neurological symptoms. In the case of negative cytological results, these clinical features, combined with increased levels of total CSF protein, can be used as a diagnostic criterion. A diagnosis could also be established when increased total CSF protein was combined with abnormal neuro-imaging findings. However, both alternatives are not useful in evaluating response to therapy.

Although it is generally agreed that multiple lumbar punctures should be performed in the case of inconclusive CSF cytodiagnosis in a patient clinically suspected of LMM, we demonstrated that repeated lumbar punctures increase the sensitivity of cytology mainly in patients with hematological malignant disease.

CHAPTER 3 describes the optimization of cytospin preparations used during cytology of CSF. Poly-L-lysine coated glass-slides were applied in an attempt to increase the fraction of cells adhering to the slides. Although increased numbers of cells did indeed become attached to the slides, this fraction was not enough to increase the sensitivity of cytodiagnosis. These findings are in contrast with the positive results found for urine samples and buccal smears, in which a poly-L-lysine coating led to a much greater increase in the number of cells on slides, subsequently increasing the sensitivity of the cytodiagnosis. One explanation for this difference might be the low levels of protein in the latter specimens, while the high protein levels of the CSF might mask the poly-L-lysine residue and thus resulting in a lower affinity for the cells.

CHAPTER 4 demonstrates the feasibility of the *in situ* hybridization (ISH) technique on cells from CSF. We found that some steps in the ISH protocol were crucial for obtaining evaluable ISH signals due to the nature and biological variation of the material studied. First of all, loss of cell morphology was a serious problem, due to the fragility of cells in CSF. This problem can be overcome by direct fixation of the CSF sample in 70% ethanol after lumbar puncture. Secondly, a tuned proteolytic pretreatment step is needed because of the high protein content of CSF. Thirdly, the time of DNA denaturation has to be short, because of the fragility of the CSF cells.

In applying the ISH method to CSF, aneusomic cells were only detected in cytologically malignant samples, whereas only disomic cells were detected in reactive CSF samples from patients with infectious neurological diseases. A DNA probe for the centromeric region of chromosome 1 was chosen for these studies. This probe is not tumor-specific, but it can be

used to screen for general aneuploidy. However, general aneuploidy develops mainly in solid tumors and is only sporadically found in hematological tumors. For these cases the use of more tumor-specific probes for the detection of specific genetic alterations is likely to provide more relevant results.

CHAPTER 5 discusses a comparison between the numerical content of chromosomes 1, 7, and 10 in malignant cells in the CSF and their corresponding leptomeningeal metastases and primary tumors. It is generally accepted that malignant cells in the CSF originate from leptomeningeal infiltration, because of morphological similarities. Before the ISH method can be used as an adequate diagnostic test in patients suspected of LMM, it is a prerequisite for a proper diagnosis that the same genotypic constitution can be detected in tumor cells from the subsequent sites. Furthermore, before the known chromosomal aberration in the CSF cells can be used in the evaluation of a response to therapy, it is important to know that these cells represent the malignant infiltration of the leptomeninges. The present study demonstrates that the genetic contents in CSF cells, leptomeningeal infiltration and primary tumor are identical with respect to the copynumbers for chromosomes 1, 7, and 10. This finding supports the assumption that cells present in the CSF are indeed shed from the LMM and that the chromosomal aberration detected in these cells represents that of the LMM.

The additional diagnostic value of the ISH method using a chromosome 1 probe in patients clinically suspected of LMM is described in CHAPTER 6. By detecting aneusomic cells in the CSF we were able to improve the diagnosis in about a third of the patients with atypical cells at first cytological examination. Unfortunately, a negative ISH result (no aneusomy detected) can not be used to exclude the presence of malignancy. In addition, a few malignant samples could not be classified as genetically aberrant. Both problems can be overcome by using either a panel of centromeric DNA probes to different chromosomes, which will increase the sensitivity, or by using tumor-specific probes to increase the specificity. Ideally, the primary tumor should be analyzed first to determine the presence and nature of genetic alterations, using sophisticated approaches, such as the comparative genomic hybridization technique. In the case of hematological malignant diseases, classical karyotyping could also be applied. Once identified, the specific genetic hallmark can be used to demonstrate cells with the same aberration in the CSF. A negative ISH result will then provide additional information, strongly indicating normal CSF.

In CHAPTER 7 it is demonstrated that the ISH technique in adjunct to CSF cytology provides a method for more accurate monitoring of response to therapy. The number of samples that could be classified as malignant was more than doubled relative to those found in the cytological examination. As a result, the evaluation of therapy in individual patients by analysis of subsequent CSF samples was more accurate in six of the seven patients. No other method has shown such an improvement in monitoring LMM treatment, although it has recently been reported that serial measurements of carcinoembryonic antigen in the case of LMM of solid tumors was also more accurate than consecutive CSF cytology. However, as

has been found for almost any tumor marker, the normal values partly overlapped the values of abnormal cases.

A larger study is needed to confirm our results and to analyze whether the outcome of LMM patients can be improved by this method.

IN CONCLUSION, it can be stated that interphase cytogenetics by means of the in situ hybridization technique is a feasible and valuable adjunct to routine CSF cytology in the cytodiagnosis of LMM. Furthermore, the response to therapy for LMM is monitored more accurately with the help of this method, which may improve the results of treatment. The use of the ISH technique with more tumor-specific probes has therefore the potential of becoming an important diagnostic test in the assessment of patients with LMM.

SAMENVATTING

INTERPHASE CYTOGENETICA IN DE CYTOLOGISCHE DIAGNOSTIEK VAN LEPTOMENINGEALE METASTASEN.

Leptomenigeale metastasen (LMM) vormen een ernstige neurologische complicatie bij kanker. Hoewel exacte gegevens over de incidentie ontbreken, worden bij ongeveer 8% van de geobduceerde patiënten met kanker LMM gevonden. Bij iedere patiënt met kanker en neurologische klachten of verschijnselen moet men bedacht zijn op LMM. Echter, LMM kunnen ook de eerste manifestatie van een maligne aandoening zijn. Aangezien een tijdige behandeling neurologische verschijnselen kan voorkomen of verminderen, is het belangrijk om de diagnose LMM zo vroeg mogelijk te stellen en bij voorkeur vóór het ontstaan van neurologische uitvalsverschijnselen.

De definitieve diagnose wordt gesteld door het aantonen van maligne cellen in de liquor cerebrospinalis (liquor) met behulp van cytologisch onderzoek. Echter, de sensitiviteit van deze methode is matig en meerdere liquor onderzoeken zijn vaak nodig om de diagnose met zekerheid te kunnen stellen waardoor de behandeling vertraging kan oplopen. Ter verbetering van de diagnostiek van LMM werden door ons verscheidene studies verricht welke beschreven worden in dit proefschrift.

Wij bepaalden eerst de aanvullende waarde van klinische kenmerken en van enkele routine diagnostische tests bij patiënten met LMM met als doel de diagnose te kunnen stellen in geval van een eerste negatief cytologisch onderzoek. Ten tweede, om de diagnostische sensitiviteit van liquorcytologie te verbeteren, werd een methode onderzocht ter verhoging van het aantal cellen op de objectglaasjes voor cytologisch onderzoek. Hierna onderzochten we de mogelijkheid en de additionele waarde van interphase cytogenetica als diagnosticum van LMM. Met interphase cytogenetica kunnen chromosomale afwijkingen worden gevisualiseerd in interphase (niet-delende) celkernen door in situ hybridisatie met gelabelde DNA probes. Deze methode werd reeds toegepast op verschillende lichaamsvloeistoffen zoals urine, pleuravocht en bloed, maar nog niet eerder op liquor cerebrospinalis.

Na het stellen van de diagnose LMM, kan met de chemo- of radiotherapeutische behandeling worden gestart. Gezien de toxiciteit van de intra-thecale chemotherapie, en voor een adequate behandeling, is het van belang om de respons op deze therapie zo nauwkeurig mogelijk te evalueren. Tot nu toe wordt dit gedaan door het aantonen van maligne cellen in opeenvolgende liquores. Echter, ten gevolge van een afname in het aantal cellen tijdens de therapie en het ontstaan van atypische cellen door de therapie, vermindert de sensitiviteit van liquorcytologie. Andere parameters zoals de klinisch neurologische toestand of de aanwezigheid van immunologische tumor merkstoffen in de liquor hebben eveneens een matige voorspellende waarde. Om deze reden werd de in situ hybridisatie techniek toegepast als een alternatief ter verbetering van het evalueren van chemotherapie.

In HOOFDSTUK 1 wordt een literatuur overzicht gegeven van de klinische kenmerken van LMM en de sensitiviteit van de meest gebruikelijke diagnostische tests. Hoewel deze studies heterogeen zijn, kon uit deze literatuur geconcludeerd worden dat de liquorcytologie, ondanks de matige sensitiviteit, nog steeds het belangrijkste diagnosticum (gouden-standaard) voor LMM is.

In HOOFDSTUK 2 worden de neurologische kenmerken bij presentatie en de waarde van routine diagnostische procedures bij vijfenveertig patiënten met bewezen LMM bestudeerd en gerelateerd aan het histologische type van de primaire maligniteit. Er was een duidelijk verschil in klinische presentatie van de twee verschillende typen LMM. Patiënten met LMM van een hematologische maligniteit toonden meestal uitval van één of meerdere hersenzenuwen, terwijl patiënten met LMM van een solide tumor zich meestal presenteerden met spinale of radriculaire verschijnselen. Echter, voor het stellen van de diagnose zijn verschillen in klinisch neurologische kenmerken bij presentatie niet bruikbaar.

Wel kon worden aangetoond dat de meerderheid van de patiënten zich presenteerden met multifocale symptomen, hetgeen in combinatie met een verhoogd eiwit in de liquor, gebruikt kan worden als diagnostisch criterium in geval van een negatief cytologisch onderzoek.

De diagnose kon eveneens gesteld worden indien een verhoogd totaal eiwit in de liquor gelijktijdig aanwezig was met afwijkende neuroradiologische bevindingen.

Hoewel in het algemeen extra lumbaal puncties worden verricht in geval van negatieve liquorcytologie bij een patiënt die op klinische gronden verdacht wordt van LMM, toonden wij aan dat vooral bij patiënten met een maligne hematologische aandoening herhaalde lumbaal puncties de sensitiviteit van liquorcytologie verhoogde.

HOOFDSTUK 3 beschrijft het optimaliseren van cytospin-preparaten, welke gebruikt worden voor de cytologische diagnostiek van liquor. Ter verhoging van het aantal cellen die zich hechten aan de objectglasjes werd een poly-L-lysine coating op deze glasjes aangebracht. Van vijftig patiënten werd de verkregen liquor verdeeld en verwerkt met de cytospinmethode met gebruik van gewone en poly-L-lysine gecoate objectglasjes. Ondanks een hoger cel aantal op de gecoate glasjes, was de toename onvoldoende om de sensitiviteit van de cytodiagnostiek van liquor te verbeteren.

In HOOFDSTUK 4 demonstreren we de mogelijkheid om de in situ hybridisatie (ISH) techniek toe te passen op cellen in de liquor. Hiertoe werd de liquor van tien patiënten met een infectieuze, neurologische aandoening en de cytologisch bewezen maligne liquor van tweeëntwintig patiënten met LMM onderzocht met de ISH methode met een chromosoom 1 specifieke probe. Met de ISH methode werden aneusome cellen alleen gevonden in de cytologisch bewezen maligne liquores, terwijl in de liquores van patiënten met een infectieuze neurologische ziekte alleen disome cellen werden aangetoond.

Wel bleek dat -door de aard van het bestudeerde materiaal en de biologische variatie hierin- sommige stappen in het ISH protocol van cruciaal belang waren voor het verkrijgen van evalueerbare ISH-signalen. Ten eerste: het verlies van celmorfologie door de fragiliteit van de liquorcellen bleek een serieus probleem. Dit probleem kon voorkomen worden door direct na de lumbaal punctie de liquor te fixeren in 70% ethanol. Ten tweede: door het hoge eiwitgehalte in de liquor was een nauwgezette proteolyse tijdens de voorbehandeling noodzakelijk. Ten derde: de duur van de DNA denaturatie diende kort te zijn, dit wederom vanwege de fragiliteit van de liquorcellen.

In HOOFDSTUK 5 wordt het aantal kopieën van de chromosomen 1, 7, en 10 van de cellen in de liquor vergeleken met de overeenkomstige leptomeningeale infiltratie en de primaire tumor. Op basis van de morfologische overeenkomst wordt aangenomen dat de maligne cellen in de liquor afkomstig zijn van de leptomeningeale metastase. Alvorens de ISH methode gebruikt kan worden als een adequate diagnostische test bij patiënten die op klinische gronden verdacht worden van LMM, is het een vereiste dat in tumorcellen op de verschillende anatomische locaties dezelfde genotypische afwijkingen worden aangetoond. Verder is het van belang om aan te tonen dat deze liquorcellen representatief zijn voor de maligne infiltratie van de hersenvliezen, alvorens een gekarakteriseerde chromosomale afwijking in de liquorcellen gebruikt kan worden als parameter ter evaluatie van een respons op behandeling. In deze studie werd aangetoond dat het genotypische profiel in liquorcellen, leptomeningeale infiltratie en in primaire tumor inderdaad identiek was voor het aantal kopieën van de chromosomen 1, 7, en 10.

In HOOFDSTUK 6 beschrijven we de additionele diagnostische waarde van de ISH methode met toepassing van een chromosoom 1 specifieke probe bij vijfenveertig patiënten die op klinische gronden verdacht werden van LMM. Hiertoe werden de resultaten van het eerste cytologisch onderzoek vergeleken met de resultaten van de ISH methode. Met cytologisch onderzoek werden tien liquores als normaal, zevenentwintig als maligne en acht als atypisch geclassificeerd. Met de ISH methode werden slechts disome cellen gevonden in de normale liquores, terwijl 71% van de evalueerbare maligne liquores een numerieke afwijking voor chromosoom 1 vertoonden. Daarnaast was het mogelijk om met behulp van het detecteren van aneusome cellen de diagnostiek te verbeteren in ongeveer een-derde van de patiënten met atypische cellen bij het eerste cytologisch onderzoek van de liquor. Een negatief ISH resultaat (geen aneusomie aangetoond) sloot echter de aanwezigheid van tumorcellen niet uit.

In HOOFDSTUK 7 wordt aangetoond dat de ISH techniek tezamen met de liquorcytologie leidt tot een accuratere evaluatie van een respons op therapie. Van zeven patiënten, die behandeld werden voor LMM, was bekend dat de maligne cellen in de liquor een numerieke afwijking voor chromosoom 1 hadden. Iedere liquor, die verkregen werd voor het toedienen van de intrathecale chemotherapie, werd cytologisch en met de ISH methode onderzocht. Hierdoor konden ongeveer anderhalf keer zo veel liquores als afwijkend worden geclassificeerd dan met cytologisch onderzoek alleen. Het evalueren van de therapie werd hierdoor accurater bij zes van de zeven patiënten. Door geen enkele methode kon tot nu toe een dergelijke verbetering van de evaluatie van de therapie van LMM worden aangetoond. Deze resultaten dienen te worden bevestigd in een grotere studie, waarin ook geanalyseerd zal moeten worden of de prognose van patiënten met LMM verbeterd als de therapie wordt geëvalueerd met behulp van de ISH techniek.

CONCLUDEREND kunnen we stellen dat interphase cytogenetica met behulp van in situ hybridisatie toepasbaar is op cellen in de liquor en een waardevolle diagnostische test is in aanvulling op routine cytologisch onderzoek voor de diagnostiek van leptomeningeale

metastasen. Ook kan de evaluatie van therapie voor leptomeningeale metastasen worden geoptimaliseerd door het gebruik van deze methode, hetgeen de behandelingsresultaten zou kunnen verbeteren. Het gebruik van de in situ hybridisatie techniek met tumor-specifieke probes kan een belangrijke diagnostische test worden voor patiënten met leptomeningeale metastasen.